

氏 名 (本籍)	梅 原 梓 里 (東京都)
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	甲第18号
学位授与年月日	平成19年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	Molecular identification of sibling species of <i>A. simplex</i> (Nematoda: Anisakidae) and characterization of their major antigen (<i>Anisakis simplex</i> の同胞種およびヒト感染虫体における主要抗原の分子生物学的解析)
論文審査委員	(主査) 内 田 明 彦 (副査) 其 木 茂 則 堂ヶ崎 知 格

論 文 内 容 の 要 旨

アニサキス亜科線虫はタラ・サバ・イカなどの海産魚介類を運搬宿主とし、これらを捕食するイルカ・クジラなどの海獣類を終宿主とする寄生性の線虫である。ヒトが同線虫の幼虫を宿した魚介類を生食した場合、幼虫に感染しアニサキス症を発症する。わが国では魚介類を生食する習慣があることから、本症の発生率は非常に高く、年間2000例から3000例に上ると推定されている。本症の原因となるアニサキス亜科の幼線虫については複数種が報告されているが、最も感染例が多いのは、*Anisakis simplex*である。*A. simplex*は形態学的に単一種とみなされていたが、近年、リボソームRNA遺伝子の塩基配列の相違から、同胞種（生殖的に隔離されており、同所的に生息するが、形態的にはほとんど区別できない近縁種の一群）として、*A. simplex sensu stricto*、*A. pegreffii*および*A. simplex C*の3種に分類されている。このような背景から、*A. simplex*同胞種に関する研究は、人獣共通感染症の疫学的研究として、大変重要であると考えられている。そこで、本研究では、(1) 日本近海における*A. simplex*同胞種の地理的分布を調査すること、(2) *A. simplex*同胞種のヒトへの感染状況を明らかにすること、更に(3) アニサキス主要抗原として報告されているAni s 1抗原について同胞種間で比較検討することを目的とした。

第1章 日本近海における *A. simplex* 同胞種の地理的分布

A. simplex 幼虫および成虫は、日本近海の広範囲な地域に生息する魚類、海棲哺乳類から見出されているが、本種の同胞種の詳細な地理的分布は明らかでない。そこで本章では、まず、日本近海産の魚類および北西北太平洋産のミンククジラより採取した*A. simplex*の幼成虫151虫体について、PCR-

RFLP解析を行い、同胞種の同定を試みた。各虫体よりゲノムDNAを抽出し、ユニバーサルプライマーを用いてリボソームRNA遺伝子の5.8Sを含むITS領域をPCR法で増幅し、制限酵素 *Hinf* I および *Hha* I によって処理した。その結果、制限酵素の切断パターンに基づき *A. simplex* s. str.、*A. pegreffii* および両同胞種の交雑型を同定した。そこで、*A. simplex* s. str. および *A. pegreffii* について、18Sから28SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を決定し、同胞種間における変異の程度を検討したところ、1353塩基中わずか2塩基のみの変異であり、相同性は99.9%であることを明らかにした。一方、各同胞種の地理的分布について解析を行ったところ、北海道近海および北西北太平洋の幼成虫110虫体は *A. simplex* s. str.、福岡県近海の幼虫37虫体は *A. pegreffii* であり、両同胞種の混合感染は認められなかった。また、北西北太平洋の成虫3虫体と福岡県近海の幼虫1虫体は交雑型であった。これより、日本近海において *A. simplex* s. str. は北太平洋、*A. pegreffii* は日本海南部に分布し、両同胞種は側所性（2種が異なった地理的領域を占めるが、それらが互いに隣接して存在する状態）の分布傾向にあることを明らかにした。

第2章 日本における *A. simplex* 同胞種のヒトへの感染状況

日本近海において *A. simplex* s. str. は北方域、*A. pegreffii* は南方域に分布していたことから、両同胞種のヒトへの感染の可能性が考えられる。しかしながら、アニサキス症患者より摘出された幼虫体を同胞種として同定した報告はわずかであり、同胞種のヒトへの感染状況は解明されていない。そこで本章では、北海道および九州地方のアニサキス症患者85名より摘出された幼虫100虫体を用い、PCR-RFLP解析により同胞種の同定を試みた。その結果、84名の患者（98.8%）は、*A. simplex* s. str. に感染し、九州地方の男性患者1名のみ *A. pegreffii* に感染していた。

わが国のアニサキス症は、北海道から沖縄まで全国的に多数の患者発生があると報告されているが、北海道ならびに九州地方といった新鮮な魚介類が手に入る沿岸地域では極めて頻度は高い。よって、本研究により日本におけるアニサキス症の主要病原虫は、*A. simplex* s. str. であることが明らかとなった。また、臨床検体の同胞種の同定は、予防医学の面からも大変重要であることを裏付けた。

第3章 同胞種間におけるアニサキス主要抗原 Ani s 1 の比較検討

アニサキス症は初感染の場合、経口摂取された幼虫が消化管粘膜に刺入すると異物肉芽腫ないし粘膜下腫瘍を形成する。しかし、あらかじめ感作を受けた患者の場合、アニサキス抗原に対して即時型アレルギー反応を生じ、急性腹症を発症する。このように、本症はアレルギー症であることから、適切な補助診断法として血清免疫学的診断法の開発が進められてきた。そして、近年本虫の主要抗原として Ani s 1 が同定されている。そこで本章では、ヒト感染例が確認された *A. simplex* s. str. および *A. pegreffii* の Ani s 1 抗原について比較検討を行った。まず、公開されている Ani s 1 抗原の cDNA 配列情報をもとに2組のプライマーを設計し、RT-Nested PCRを行った。得られた ORF 領域の増幅産物はクローニングし、塩基配列を決定した。クローニングした ORF の cDNA は、194 アミノ酸をコードし、

分子量約19KDaと推定された。また、モチーフ配列より Kunitz 型トリプシンインヒビターに属すると考えられた。*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* のアミノ酸配列を比較した結果、成熟タンパク質の配列内に5ヶ所のアミノ酸置換を見出した。

次に、5ヶ所のアミノ酸置換と抗原性の関係を検討するため、大腸菌発現ベクターにシグナルペプチド領域を切除した ORF の cDNA をサブクローニングし、発現・抽出・精製した組換えタンパク質は、*A. simplex* s. str. を実験的に感染させたラット血清による免疫ブロッティングに用いた。その結果、各同胞種の cDNA より合成した組換えタンパク質に対して抗 *A. simplex* s. str. ラット血清の陽性反応が認められた。しかしながら、ラット抗血清について両同胞種の各組換え抗原で吸収試験を行ったところ、*A. simplex* s. str. の組換え抗原によって吸収した血清は完全な吸収効果を示し、両同胞種の組換え Ani s 1 に全く反応を示さなかった。一方、*A. pegreffii* の組換え抗原によって吸収した血清は、部分的な吸収効果しか示さず、*A. pegreffii* の組換え Ani s 1 には全く反応を示さなかったが、*A. simplex* s. str. の組換え Ani s 1 に対しては反応が認められた。このことから、Ani s 1 の抗原多型を応用することで、アニサキス症のより正確な血清診断および原因虫体の同定が可能となった。

海に囲まれ、魚介類を生食する習慣を持つわが国では、従来からアニサキスの研究が進展してきたが、これまで *A. simplex* の同胞種に関する報告はほとんどなかった。更に臨床検体の同胞種の同定については、世界でもわずかな報告しかされていない。本研究は、日本における *A. simplex* 同胞種の分布とアニサキス症の主要病原虫を明らかにした初めての報告であり、これらの成果はわが国のアニサキス症予防対策を考える上で重要である。また、アレルゲンとなるタンパク質をコードする cDNA 塩基配列の解析により、抗原タンパク質のアミノ酸配列に同胞種間での変異を見出した。本研究で得られた研究成果は、アニサキス症の血清診断法を確立する上で、大変重要な知見である。

論文審査の結果の要旨

アニサキス亜科線虫は海産魚介類を運搬宿主とし、これらを捕食するイルカ・クジラなどの海獣類を終宿主とする線虫類である。ヒトが同線虫の幼虫を宿した魚介類を生食した場合、幼虫が感染してアニサキス症を発症する。わが国では魚介類を生食する習慣があることから、本症の発生率は非常に高く、年間3000例以上の感染者いると推定されている。本症の原因となるアニサキス亜科の幼線虫については複数の種が報告されているが、最も感染例が多いのは、*Anisakis simplex* である。*A. simplex* は形態学的に単一種とみなされていたが、近年、リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列の相違から、同胞種として、*A. simplex sensu stricto*、*A. pegreffii* および *A. simplex* C の3種に分類されている。このような背景から、*A. simplex* 同胞種に関する研究は、臨床的にも、人獣共通寄生虫症の疫学的研究としても、大変重要である。そこで、本研究では、(1) 日本近海における *A. simplex* 同胞種の地理的分布を明らかにする、(2) *A. simplex* 同胞種のヒトへの感染状況を明らかにすること、更に (3) アニサキス主要抗原として報告されている Ani s 1 抗原について同胞種間で比較検討することを目的とした。

第一章 日本近海における *A. simplex* 同胞種の地理的分布

A. simplex 幼虫および成虫は、日本近海の広範囲な地域に生息する魚類、海棲哺乳類から見出されているが、本種の同胞種の詳細な地理的分布は明らかでない。そこで、日本近海産の魚類および北西北太平洋産のミンククジラより採取した *A. simplex* の幼・成虫 151 虫体について、PCR-RFLP 解析を行い、同胞種の同定を行った。各虫体よりゲノム DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーを用いてリボソーム RNA 遺伝子の 5.8S を含む ITS 領域を PCR 法で増幅し、制限酵素 *Hinf* I および *Hha* I によって処理した。その結果、制限酵素の切断パターンに基づき *A. simplex* s. str.、*A. pegreffii* および両同胞種の交雑型と同定した。そこで、*A. simplex* s. str. および *A. pegreffii* について、18S から 28S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を決定し、同胞種間における変異の程度を検討したところ、1353 塩基中わずか 2 塩基のみの変異であり、相同性は 99.9% であることを明らかにした。一方、各同胞種の地理的分布について解析を行ったところ、北海道近海および北西北太平洋に生息するのホッケ、マサバ、チカ、スケトウダラ、ミンククジラから得た幼・成虫 110 虫体は *A. simplex* s. str.、福岡県近海で採取したマサバからの幼虫 37 虫体は *A. pegreffii* であり、両同胞種の混合感染は認められなかった。また、北西北太平洋のミンククジラより得た成虫 3 虫体と福岡県近海の幼虫 1 虫体は交雑型であった。これより、日本近海において *A. simplex* s. str. は北太平洋、*A. pegreffii* は日本海南部に分布していることが明らかとなった。

第2章 日本における *A. simplex* 同胞種のヒトへの感染状況

日本近海において *A. simplex* s. str. は北方域、*A. pegreffii* は南方域に分布していたことから、両同胞種のヒトへの感染の可能性が考えられる。しかしながら、アニサキス症患者より摘出された幼虫体を同胞種として同定した報告はわずかに 2 症例のみであり、同胞種のヒトへの感染状況は解明されていない。そこで、北海道および九州地方のアニサキス症患者 85 名より摘出された幼虫 100 虫体を用い、PCR-RFLP 解析により同胞種の同定を行った。その結果、84 名の患者 (98.8%) は、*A. simplex* s. str. に感染していた。一方、*A. pegreffii* は、九州地方の男性患者 1 名から摘出された 1 虫体のみであった。

わが国のアニサキス症は、北海道から沖縄まで全国的に多数の患者発生があると報告されているが、北海道ならびに九州地方といった新鮮な魚介類が手に入る沿岸地域では極めて頻度は高い。よって *A. simplex* s. str. は、日本におけるアニサキス症の主要病原虫と考えられた。また、本研究の結果から同胞種と感染性の違いについても関連が明らかとなり、臨床上からも同胞種の同定は、予防医学、公衆衛生の面からも大変重要であることを裏付けた。

第3章 同胞種間におけるアニサキス主要抗原 Ani s 1 の比較検討

アニサキス症は初感染の場合、経口摂取された幼虫が消化管粘膜に刺入すると異物肉芽腫あるいは粘膜下に腫瘍を形成する。しかし、あらかじめ感作を受けた患者の場合、アニサキス抗原に対して即時型アレルギー反応を生じ、急性腹症を発症する。このように、本症はアレルギー症であることから、適切な補助診断法として血清免疫学的診断法の開発が進められてきた。そして、近年本虫の主要抗原

として Ani s 1 が知られている。そこで本章では、ヒト感染例が確認された *A. simplex* s. str. および *A. pegreffii* の Ani s 1 抗原について比較検討を行った。まず、公開されている Ani s 1 抗原の cDNA 配列情報をもとに 2 組のプライマーを設計し、RT-Nested PCR を行った。得られた ORF 領域の増幅産物はクローニングし、塩基配列を決定した。クローニングした ORF の cDNA は、194 アミノ酸をコードし、分子量約 19KDa と推定された。また、モチーフ配列より Kunitz 型トリプシンインヒビターに属すると考えられた。*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* のアミノ酸配列を比較した結果、成熟タンパク質の配列内に 5 ケ所のアミノ酸置換を見出した。

次に、5 ケ所のアミノ酸置換と抗原性の関係を検討するため、大腸菌発現ベクターにシグナルペプチド領域を切除した ORF の cDNA をサブクローニングし、発現・抽出・精製した組換えタンパク質は、*A. simplex* s. str. を実験的に感染させたラット血清による免疫ブロッティングに用いた。その結果、各同胞種の cDNA より合成した組換えタンパク質に対して抗 *A. simplex* s. str. ラット血清の陽性反応が認められた。しかしながら、ラット抗血清について *A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* の各組換え Ani s 1 で吸収試験を行ったところ、*A. simplex* s. str. では完全な吸収がみられたが、*A. pegreffii* では *A. simplex* s. str. に対する完全な吸収がみられなかった。このことから、Ani s 1 の抗原多型を応用することで、より正確な血清診断および原因虫体の同定が可能となった。

以上のように、本研究はわが国におけるアニサキス症の実態を感染源である海産魚介類の基礎的な疫学調査により明らかとなり、ヒトにおける感染虫体種の解明、臨床上での診断を確立し、寄生虫学、公衆衛生学の発展に寄与すること大であり、博士（学術）の学位授与に値するものと認める。